

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 C07K 7/64, A61K 38/13	A1	(11) 国際公開番号 WO97/11092 (43) 国際公開日 1997年3月27日 (27.03.97)
(21) 国際出願番号 PCT/JP95/01906 (22) 国際出願日 1995年9月21日 (21.09.95) (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 日本新薬株式会社 (NIPPON SHINYAKU CO., LTD.)[JP/JP] 〒601 京都府京都市南区吉祥院西ノ庄門口町14番地 Kyoto, (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 今野清隆(KONNO, Kiyotaka)[JP/JP] 〒610-11 京都府京都市西京区大原野西境谷町二丁目9-9-304 Kyoto, (JP) 瀬戸隆志(SETO, Takashi)[JP/JP] 〒612 京都府京都市伏見区中島河原田町31-1-315 Kyoto, (JP) 吉房寛人(YOSHIFUSA, Hiroto)[JP/JP] 〒569 大阪府高槻市芝谷町20-12 Osaka, (JP) 江連洋治(EZURE, Yoji)[JP/JP] 〒520-21 滋賀県大津市野郷原2-21-22 Shiga, (JP)		(81) 指定国 CA, CN, JP, KR, RU, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
(54)Title: CYCLOSPORIN PHOSPHATE DERIVATIVES AND MEDICINAL COMPOSITION (54)発明の名称 シクロスポリン類のリン酸エステル誘導体及び医薬組成物 (57) Abstract Novel cyclosporins having a high water-solubility, a high peroral absorbability and a reduced nephrotoxicity and a medicinal composition containing the same. The compounds include phosphates, salts thereof and solvates thereof of [phosphonothreonine ²]cyclosporin A, [phosphono-4-hydroxynorvaline ²]cyclosporin A, [phosphono-D-serine ³]cyclosporin A, and [phosphonothreonine ² , phosphono-D-serine ³]cyclosporin A.		

(57) 要約

本発明は、水溶性及び経口投与した場合の吸収性が高く、かつ腎毒性が低い新規なシクロスポリン類及びそれを含有する医薬組成物を提供することにある。

本発明は、例えば、〔フォスフォノトレオニン²〕シクロスポリンA、〔フォスフォノ-4-ヒドロキシノルバリン²〕シクロスポリンA、〔フォスフォノ-D-セリン²〕シクロスポリンA、〔フォスフォノトレオニン²、フォスフォノ-D-セリン²〕シクロスポリンAのようなシクロスポリン類のリン酸エステル誘導体若しくはその塩、又はそれらの溶媒和物を挙げることができる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	EE	エストニア	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AM	アルメニア	ES	スペイン	LS	レソト	SD	スーダン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
AU	オーストラリア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
AZ	アゼルバイジャン	GB	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア共和国
BB	バルバドス	GE	イギリス	MC	モナコ	SK	スロヴァキア共和国
BE	ベルギー	GR	ギリシャ	MD	モルドバ	SS	スワジランド
BG	ブルガリア	GU	グアテマラ	MG	マダガスカル	ST	セネガル
BJ	ベナン	HN	ホンジュラス	MK	マケドニア	TD	チャド
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	ML	マリ	TG	トーゴ
BY	ベラルーシ	IE	アイアランド	MN	モンゴル	TJ	タジキスタン
CA	カナダ	IT	イタリア	MR	モーリタニア	TM	トルクメニスタン
CC	中央アフリカ共和国	JP	日本	MW	マラウイ	TR	トルコ
CG	コンゴ	KE	ケニア	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	KG	キルギスタン	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CI	コート・ジボアール	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NL	オランダ	US	米国
CM	カメルーン	KZ	カザフスタン	NZ	ニュージーランド	UZ	ウズベキスタン共和国
CN	中国	LI	リベリア	PT	ポルトガル	VN	ベトナム
DE	ドイツ	LK	スリランカ	RO	ルーマニア	YU	ユーゴスラビア
DK	デンマーク						

明 細 書

シクロスポリン類のリン酸エステル誘導体及び医薬組成物

技 術 分 野

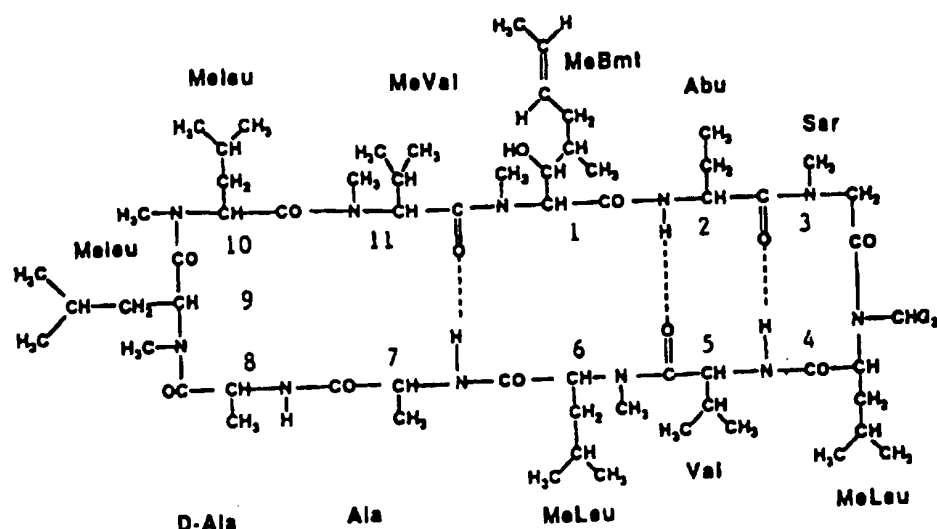
本発明は、シクロスポリン類のリン酸エステル誘導体に関するものである。詳しくは、医薬、特に免疫抑制剤として有用なシクロスポリン類のリン酸エステル誘導体に関するものである。

背 景 技 術

シクロスポリン類は、トリボクラジウム・インフラータム（*Tolypocladium inflatum*）などの糸状菌によって産生される11個のアミノ酸から構成される環状ペプチドである。シクロスポリン類は、リンパ球に対し、特異的かつ可逆的に作用し、強力な免疫抑制作用、抗炎症作用を有するものが多い。これらの薬理活性については、これまでに多数の報告がある（例えば、R.Y.Calne, *Trend in Pharmaceutical Sciences: Immunosuppressive in Clinical Organ Grafting*, 1巻（1979年）21-22 頁、R. Y. Calne, *Nephron*, 26巻（1980年）57-63頁など）。

シクロスポリン類は、メルク・インデックスにも収載されている化合物であり、これまで多くの化合物が知られている。例えば、

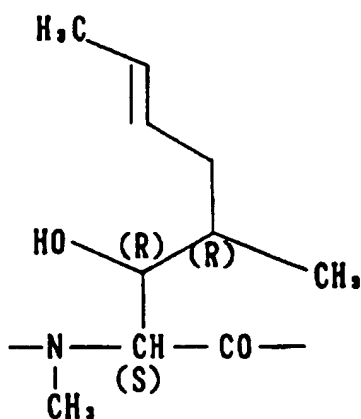
「R.M.Wengerら著、*Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 50巻、157 頁、Springer-Verlag 社発刊、W. Herzら編集」には、真菌類が生産するシクロスポリン類の一覧表が記載されている。これを次に示す。



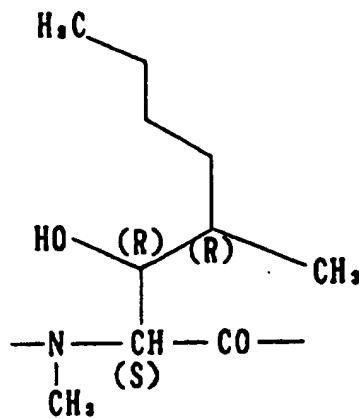
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	MeBmt	L-Abu	Sar	L-MeLeu	L-Val	L-MeLeu	L-Ala	D-Ala	L-MeLeu	L-MeLeu	L-MeVal
B	MeBmt	L-Ala	Sar	L-MeLeu	L-Val	L-MeLeu	L-Ala	D-Ala	L-MeLeu	L-MeLeu	L-MeVal
C	MeBmt	L-Thr	Sar	L-MeLeu	L-Val	L-MeLeu	L-Ala	D-Ala	L-MeLeu	L-MeLeu	L-MeVal
D	MeBmt	L-Val	Sar	L-MeLeu	L-Val	L-MeLeu	L-Ala	D-Ala	L-MeLeu	L-MeLeu	L-MeVal
E	MeBmt	L-Abu	Sar	L-MeLeu	L-Val	L-MeLeu	L-Ala	D-Ala	L-MeLeu	L-MeLeu	L-Val
F	deoxyMeBmt	L-Abu	Sar	L-MeLeu	L-Val	L-MeLeu	L-Ala	D-Ala	L-MeLeu	L-MeLeu	L-MeVal
G	MeBmt	L-Nva	Sar	L-MeLeu	L-Val	L-MeLeu	L-Ala	D-Ala	L-MeLeu	L-MeLeu	L-MeVal
H	MeBmt	L-Abu	Sar	L-MeLeu	L-Val	L-MeLeu	L-Ala	D-Ala	L-MeLeu	L-MeLeu	D-MeVal
I	MeBmt	L-Val	Sar	L-MeLeu	L-Val	L-MeLeu	L-Ala	D-Ala	L-MeLeu	L-Leu	L-MeVal
K	deoxyMeBmt	L-Val	Sar	L-MeLeu	L-Val	L-MeLeu	L-Ala	D-Ala	L-MeLeu	L-MeLeu	L-MeVal
L	Bmt	L-Abu	Sar	L-MeLeu	L-Val	L-MeLeu	L-Ala	D-Ala	L-MeLeu	L-MeLeu	L-MeVal
M	MeBmt	L-Nva	Sar	L-MeLeu	L-Nva	L-MeLeu	L-Ala	D-Ala	L-MeLeu	L-MeLeu	L-MeVal
N	MeBmt	L-Nva	Sar	L-MeLeu	L-Val	L-MeLeu	L-Ala	D-Ala	L-MeLeu	L-Leu	L-MeVal
O	L-MeLeu	L-Nva	Sar	L-MeLeu	L-Val	L-MeLeu	L-Ala	D-Ala	L-MeLeu	L-MeLeu	L-MeVal
P	Bmt	L-Thr	Sar	L-MeLeu	L-Val	L-MeLeu	L-Ala	D-Ala	L-MeLeu	L-MeLeu	L-MeVal
Q	MeBmt	L-Abu	Sar	L-Val	L-Val	L-MeLeu	L-Ala	D-Ala	L-MeLeu	L-MeLeu	L-MeVal
R	MeBmt	L-Abu	Sar	L-Leu	L-Val	L-Leu	L-Ala	D-Ala	L-MeLeu	L-MeLeu	L-MeVal
S	MeBmt	L-Thr	Sar	L-Val	L-Val	L-MeLeu	L-Ala	D-Ala	L-MeLeu	L-MeLeu	L-MeVal
T	MeBmt	L-Abu	Sar	L-MeLeu	L-Val	L-MeLeu	L-Ala	D-Ala	L-MeLeu	L-MeLeu	L-MeVal
U	MeBmt	L-Abu	Sar	L-MeLeu	L-Val	L-Leu	L-Ala	D-Ala	L-MeLeu	L-MeLeu	L-MeVal
V	MeBmt	L-Abu	Sar	L-MeLeu	L-Val	L-MeLeu	L-Abu	D-Ala	L-MeLeu	L-MeLeu	L-MeVal
W	MeBmt	L-Thr	Sar	L-MeLeu	L-Val	L-MeLeu	L-Ala	D-Ala	L-MeLeu	L-MeLeu	L-MeVal
X	MeBmt	L-Nva	Sar	L-MeLeu	L-Val	L-MeLeu	L-Ala	D-Ala	L-Leu	L-MeLeu	L-MeVal
Y	MeBmt	L-Nva	Sar	L-MeLeu	L-Val	L-Leu	L-Ala	D-Ala	L-MeLeu	L-MeLeu	L-MeVal
Z	*	L-Abu	Sar	L-MeLeu	L-Val	L-MeLeu	L-Ala	D-Ala	L-MeLeu	L-MeLeu	L-MeVal

表中、最上欄の1から11の番号は、上記シクロスポリンAの構造式に付されている番号に対応するアミノ酸の位置番号を意味し、縦に並んでいるAからZまでの記号はシクロスポリン類の種類を意味

する。また、MeBmt は構造式 (Ⅱ) で示される N-メチル-(4R)-4-ブタ-2E-エン-1-イル-4-メチル-(L)トレオニン又は構造式 (Ⅲ) で示される (Ⅱ) のジヒドロ体を、DeoxyBmt は N-メチル-(4R)-4-ブタ-2E-エン-1-イル-4-メチル-(L)- α -アミノ酪酸を、Bmt は (4R)-4-ブタ-2E-エン-1-イル-4-メチル-(L)トレオニンを、* は N-メチル-2-アミノオクタノン酸を、Sar はザルコシン (sarcosine、N-メチル-L-グリシン) を、Abu は α -アミノ酪酸 (L- α -aminobutylic acid) を、Ala はアラニンを、Leu はロイシンを、MeLeu は N-メチル-L-ロイシン (N-methyl-L-leucine) を、MeVal は N-メチル-L-バリン (N-methyl-L-leucine) を、Nva はノルバリンを、Thr はトレオニンを、Val はバリンを、接頭語の D は D 型を、接頭語の L は L 型を、それぞれ表す。



(Ⅱ)



(Ⅲ)

8 位に D-セリンを置換したシクロスポリン類も知られている (R. Traber ら、J. Antibiot., 42巻、591-597 頁、1989年)。2 位が 3-ヒドロキシノルバリン、4-ヒドロキシノルバリンなどに置換さ

れたシクロスポリンも報告されている (C. Papageogiou et al、
Bioorganic & Medical Chemistry Letters、13巻、2529-2564 頁、
1993年)。

更に、特開昭52-59180号公報、特開昭56-128725 号公報、特開昭
57-140753 号公報、特開昭60-215700 号公報、特開昭61-212599 号
公報、特開昭62-77399号公報、特開平2-137 号公報などにもシクロ
スポリン類が開示されている。

シクロスポリン類は免疫抑制作用等を有することから、種々のシ
クロスポリン類を含有する医薬組成物が提案されている (特表平5-
500964号公報、特表平5-503306号公報、特開平5-208996号公報、特
開平5-310591号公報、特表平5-507903号公報など)。実際にシクロ
スポリンAについては、カプセル、内用液、注射液の剤型で市販さ
れている。

しかしながら、これまで知られているシクロスポリン類は、難水
溶性であり、腎毒性があり、経口投与した場合には吸収率が良くな
いという問題点などが報告されている (シクロスポリンAの副作用
について、M. J. Mihatsch et al, Toxicology Letters, 46巻, 125-
139 頁, 1989年、B. Ryffel, Arch Toxicology, 53巻, 107-141 頁,
1983年など)。

ところで、シクロスポリン類がリン酸エステル化された化合物及
びそれを含有する医薬組成物は知られていない。そればかりかポリ
ペプチドをリン酸エステル化することによって、水溶性を高め、吸
収性を向上させると共に、腎毒性の軽減をもたらした例も見当たら
ない。

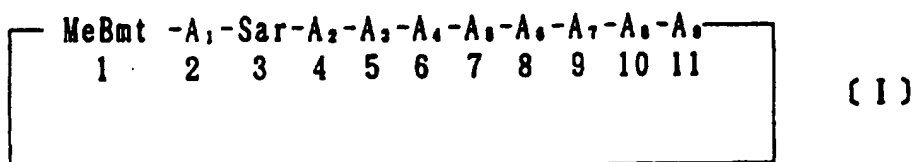
発 明 の 開 示

本発明の目的は、水溶性及び経口投与した場合の吸収性が高く、かつ腎毒性が低い新規なシクロスポリン類及びそれを含有する医薬組成物を提供することにある。

本発明は、水酸基を有するアミノ酸を構成要素とするシクロスポリン類において、該水酸基の全部又は一部がリン酸エステル（ $-P(O)(OH)_2$ ）化されているシクロスポリン類のリン酸エステル誘導体若しくはその塩、又はそれらの溶媒和物（水和物を含む）である。

本発明は、水酸基を有するアミノ酸を構成要素とするシクロスポリン類の水酸基の全部又は一部がリン酸エステル化されているところに特徴を有する。

水酸基を有するアミノ酸を構成要素とするシクロスポリン類としては、例えば、次の構造式〔I〕で表される化合物若しくはその塩、又はそれらの溶媒和物（水和物を含む。以下これらを「本発明化合物」という）を挙げることができる。



ここで、A₁はD-若しくはL- α -アミノ酪酸、D-若しくはL-アラニン、D-若しくはL-トレオニン、D-若しくはL-バリン、D-若しくはL-3-ヒドロキシノルバリン又はD-若しくはL-4-ヒドロキシノルバリンを表し、A₂はD-若しくはL-N-メチルロイシン、D-若しくはL-ロイシ

ン又はD-若しくはL-バリンを表し、A₂はD-若しくはL-バリン又はD-若しくはL-ノルバリンを表し、A₃はD-若しくはL-ロイシン又はD-若しくはL-メチルロイシンを表し、A₄はD-若しくはL-アラニン又はD-若しくはL- α -アミノ酪酸を表し、A₅はD-若しくはL-アラニン又はD-若しくはL-セリンを表し、A₆はD-若しくはL-メチルロイシン又はD-若しくはL-ロイシンを表し、A₇はD-若しくはL-メチルロイシン又はD-若しくはL-ロイシンを表し、A₈はD-若しくはL-バリン又はD-若しくはL-メチルバリンを表す。MeBmt、Sarは、前記と同じである。1-11の番号は、アミノ酸の位置略称のための番号を表す。

この中、A₁がL-トレオニンであるもの、又はA₈がD-セリンであるものが好ましい。また、〔トレオニン²〕シクロスポリンA、〔4-ヒドロキシノルバリン²〕シクロスポリンA、〔D-セリン⁸〕シクロスポリンA又は〔トレオニン²、D-セリン⁸〕シクロスポリンAであるものが好ましい。

ここで、本発明に係るシクロスポリン類の命名方法について説明する。

①特にD-の記載のないアミノ酸は、全てL-アミノ酸を意味するものとする。

②シクロスポリンAを基準にとり、シクロスポリンAと異なるアミノ酸を有するシクロスポリンに対し、異なるアミノ酸の種類と置換した位置を次のように示す。例えば、〔トレオニン²〕シクロスポリンA、〔トレオニン²、D-セリン⁸〕シクロスポリンAにおいて、前者はシクロスポリンAの2位のアミノ酸がトレオニンに置換したシクロスポリンAを、後者はシクロスポリンAの2位のアミノ酸が

トレオニンに且つ8位のアミノ酸がD-セリンに置換したシクロスポリンAを意味するものとする。また、〔フォスフォノトレオニン³〕シクロスポリンA、〔フォスフォノ-D-セリン³〕シクロスポリンAにおいては、前者はシクロスポリンAの2位のアミノ酸がL-トレオニンに置換し且つそのL-トレオニンの水酸基がリン酸エステル化された化合物を、後者はシクロスポリンAの8位のアミノ酸がD-セリンに置換し且つそのD-セリンの水酸基がリン酸エステル化された化合物を意味するものとする（アミノ酸の位置については、構造式（I）を参照）。また、〔フォスフォノ-D-セリン³〕シクロスポリンA 二ナトリウム塩は、〔フォスフォノ-D-セリン³〕シクロスポリンAのリン酸基が二ナトリウム塩となった化合物を意味するものとする。

本発明化合物のいくつかを以下に挙げる。本発明化合物はこれらに限定されるものではない。

〔フォスフォノトレオニン³〕シクロスポリンA、
〔フォスフォノトレオニン³〕シクロスポリンA 一ナトリウム塩、
〔フォスフォノトレオニン³〕シクロスポリンA 二ナトリウム塩、
〔フォスフォノトレオニン³〕シクロスポリンA 二カリウム塩、
〔フォスフォノ-D-セリン³〕シクロスポリンA、
〔フォスフォノ-D-セリン³〕シクロスポリンA 一ナトリウム塩、
〔フォスフォノ-D-セリン³〕シクロスポリンA 二ナトリウム塩、
〔フォスフォノ-D-セリン³〕シクロスポリンA 二カリウム塩、
〔フォスフォノ-D-セリン³〕シクロスポリンA 二ベンジルアミン塩、

〔フォスフォノトレオニン³、フォスフォノ-D- セリン⁴〕シクロ
スポリンA、

〔フォスフォノトレオニン³、フォスフォノ-D- セリン⁴〕シクロ
スポリンA ニナトリウム塩、

〔フォスフォノトレオニン³、フォスフォノ-D- セリン⁴〕シクロ
スポリンA 四ナトリウム塩、

〔フォスフォノトレオニン³、フォスフォノ-D- セリン⁴〕シクロ
スポリンA 四カリウム塩、

〔フォスフォノ-D- トレオニン³〕シクロスポリンA、

〔フォスフォノ-D- トレオニン³〕シクロスポリンA ニナトリウ
ム塩、

〔フォスフォノ-D- トレオニン³〕シクロスポリンA ニカリウム
塩、

〔フォスフォノ-D- トレオニン³〕シクロスポリンB、

〔フォスフォノ-D- トレオニン³〕シクロスポリンB ニナトリウ
ム塩、

〔フォスフォノ-D- トレオニン³〕シクロスポリンB ニカリウム
塩、

〔フォスフォノ-D- トレオニン³〕シクロスポリンC、

〔フォスフォノ-D- トレオニン³〕シクロスポリンC ニナトリウ
ム塩、

〔フォスフォノ-D- トレオニン³〕シクロスポリンC ニカリウム
塩、

〔フォスフォノ-D- トレオニン³〕シクロスポリンD、

〔フォスフォノ-D-トレオニン¹〕シクロスポリンD ニナトリウム塩、

〔フォスフォノ-D-トレオニン¹〕シクロスポリンD ニカリウム塩、

〔フォスフォノ-D-トレオニン¹〕シクロスポリンE、

〔フォスフォノ-D-トレオニン¹〕シクロスポリンE ニナトリウム塩、

〔フォスフォノ-D-トレオニン¹〕シクロスポリンE ニカリウム塩、

〔フォスフォノ-D-トレオニン¹〕シクロスポリンF、

〔フォスフォノ-D-トレオニン¹〕シクロスポリンF ニナトリウム塩、

〔フォスフォノ-D-トレオニン¹〕シクロスポリンF ニカリウム塩、

〔フォスフォノ-D-トレオニン¹〕シクロスポリンG、

〔フォスフォノ-D-トレオニン¹〕シクロスポリンG ニナトリウム塩、

〔フォスフォノ-D-トレオニン¹〕シクロスポリンG ニカリウム塩、

〔フォスフォノ-D-トレオニン¹〕シクロスポリンH、

〔フォスフォノ-D-トレオニン¹〕シクロスポリンH ニナトリウム塩、

〔フォスフォノ-D-トレオニン¹〕シクロスポリンH ニカリウム塩、

〔フォスフォノ-D-トレオニン⁸〕シクロスポリンI、

〔フォスフォノ-D-トレオニン⁸〕シクロスポリンI ニナトリウム塩、

〔フォスフォノ-D-トレオニン⁸〕シクロスポリンI ニカリウム塩、

〔フォスフォノ-D-トレオニン⁸〕シクロスポリンK、

〔フォスフォノ-D-トレオニン⁸〕シクロスポリンK ニナトリウム塩、

〔フォスフォノ-D-トレオニン⁸〕シクロスポリンK ニカリウム塩、

〔フォスフォノ-D-トレオニン⁸〕シクロスポリンL、

〔フォスフォノ-D-トレオニン⁸〕シクロスポリンL ニナトリウム塩、

〔フォスフォノ-D-トレオニン⁸〕シクロスポリンL ニカリウム塩、

〔フォスフォノ-D-トレオニン⁸〕シクロスポリンM、

〔フォスフォノ-D-トレオニン⁸〕シクロスポリンM ニナトリウム塩、

〔フォスフォノ-D-トレオニン⁸〕シクロスポリンM ニカリウム塩、

〔フォスフォノ-D-トレオニン⁸〕シクロスポリンO、

〔フォスフォノ-D-トレオニン⁸〕シクロスポリンO ニナトリウム塩、

〔フォスフォノ-D-トレオニン⁸〕シクロスポリンO ニカリウム

塩、

〔フォスフォノ-D-トレオニン⁸〕シクロスポリンP、

〔フォスフォノ-D-トレオニン⁸〕シクロスポリンP ニナトリウム塩、

〔フォスフォノ-D-トレオニン⁸〕シクロスポリンP ニカリウム塩、

〔フォスフォノ-D-トレオニン⁸〕シクロスポリンQ、

〔フォスフォノ-D-トレオニン⁸〕シクロスポリンQ ニナトリウム塩、

〔フォスフォノ-D-トレオニン⁸〕シクロスポリンQ ニカリウム塩、

〔フォスフォノ-D-トレオニン⁸〕シクロスポリンR、

〔フォスフォノ-D-トレオニン⁸〕シクロスポリンR ニナトリウム塩、

〔フォスフォノ-D-トレオニン⁸〕シクロスポリンR ニカリウム塩、

〔フォスフォノ-D-トレオニン⁸〕シクロスポリンS、

〔フォスフォノ-D-トレオニン⁸〕シクロスポリンS ニナトリウム塩、

〔フォスフォノ-D-トレオニン⁸〕シクロスポリンS ニカリウム塩、

〔フォスフォノ-D-トレオニン⁸〕シクロスポリンT、

〔フォスフォノ-D-トレオニン⁸〕シクロスポリンT ニナトリウム塩、

〔フォスフォノ-D-トレオニン⁸〕シクロスポリンT ニカリウム塩、

〔フォスフォノ-D-トレオニン⁸〕シクロスポリンU、

〔フォスフォノ-D-トレオニン⁸〕シクロスポリンU ニナトリウム塩、

〔フォスフォノ-D-トレオニン⁸〕シクロスポリンU ニカリウム塩、

〔フォスフォノ-D-トレオニン⁸〕シクロスポリンV、

〔フォスフォノ-D-トレオニン⁸〕シクロスポリンV ニナトリウム塩、

〔フォスフォノ-D-トレオニン⁸〕シクロスポリンV ニカリウム塩、

〔フォスフォノ-D-トレオニン⁸〕シクロスポリンW、

〔フォスフォノ-D-トレオニン⁸〕シクロスポリンW ニナトリウム塩、

〔フォスフォノ-D-トレオニン⁸〕シクロスポリンW ニカリウム塩、

〔フォスフォノ-D-トレオニン⁸〕シクロスポリンX、

〔フォスフォノ-D-トレオニン⁸〕シクロスポリンX ニナトリウム塩、

〔フォスフォノ-D-トレオニン⁸〕シクロスポリンX ニカリウム塩、

〔フォスフォノ-D-トレオニン⁸〕シクロスポリンY、

〔フォスフォノ-D-トレオニン⁸〕シクロスポリンY ニナトリウム

ム塩、

〔フォスフォノ-D-トレオニン¹〕シクロスポリンY ニカリウム

塩、

〔フォスフォノ-D-トレオニン¹〕シクロスポリンZ、

〔フォスフォノ-D-トレオニン¹〕シクロスポリンZ ニナトリウム

ム塩、

〔フォスフォノ-D-トレオニン¹〕シクロスポリンZ ニカリウム

塩、

〔フォスフォノ-D-トレオニン¹、フォスフォノトレオニン²〕シ

クロスポリンA、

〔フォスフォノ-D-トレオニン¹、フォスフォノトレオニン²〕シ

クロスポリンA ニナトリウム塩、

〔フォスフォノ-D-トレオニン¹、フォスフォノトレオニン²〕シ

クロスポリンA ニカリウム塩、

〔フォスフォノヒドロキシノルバリン³〕シクロスポリンA、

〔フォスフォノヒドロキシノルバリン³〕シクロスポリンA ニナ

トリウム塩、

〔フォスフォノヒドロキシノルバリン³〕シクロスポリンA ニカ

リウム塩、

〔フォスフォノヒドロキシノルバリン³、フォスフォノ-D-セリン⁴

〕シクロスポリンA、

〔フォスフォノヒドロキシノルバリン³、フォスフォノ-D-セリン⁴

〕シクロスポリンA ニナトリウム塩、

〔フォスフォノヒドロキシノルバリン³、フォスフォノ-D-セリン⁴

〕シクロスポリンA ニカリウム塩。

この中、〔フォスフォノ-D-セリン⁸〕シクロスポリンA ニナトリウム塩が好ましい。

発明を実施するための最良の形態

次に本発明化合物の製造方法について説明する。

本発明化合物の合成原料となる各種のシクロスポリン類は、これまでに知られている公知の方法を用いて合成することができる。その方法が記載されている文献としては、例えば、特開昭52-59180号公報、特開昭56-128725号公報、特開昭57-140753号公報、特開昭60-215700号公報、特開昭61-212599号公報、特開昭62-77399号公報、特開平2-137号公報及びその他前記した文献などを挙げることができる。

リン酸エステル化の反応も公知の方法で行なうことができる。例えば、リン酸化剤としては、酸クロリド型リン酸化剤（オキシ塩化リン、フェニルリン酸ジクロリド、ジフェニルリン酸クロリド、ジベンジルリン酸クロリド、p-ニトロフェニルリン酸ジクロリド、ジモルフォリノリン酸クロリド、ビス（ β , β , β -トリクロロエチル）リン酸、p-ジフェニル-p'-モルホリノピロリン酸クロリドなど）を用いる方法、酸無水物型リン酸化剤（0-ベンジル亜リン酸 0-ジフェニルリン酸無水物、テトラ（パラニトロフェニル）ピロリン酸、テトラクロロピロリン酸、ジフェニルリン酸無水物、など）を用いる方法、イミドイルリン酸を中間体とする方法（ β -シアノエチルリン酸とジシクロヘキシルカルボジイミド、モノベンジルリン酸とジシクロヘキシルカルボジイミドなど）、三塩化リン、トリス

(8-キノリル) リン酸、2-(N,N-ジメチルアミノ)-4-ニトロフェニルリン酸などのその他のリン酸化剤を用いる方法などである。溶媒としては、ピリジン、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、クロロホルム、メチレンクロリド、メタノール、エタノールなどである。ピリジン以外の溶媒を用いた時は、ピリジン、2,6-ジメチルピリジンなどの適当な塩基を加えても良い。反応温度は、通常、0-100℃であるが、必要に応じて更に冷却または加温して行なうこともできる。反応時間は、通常、数時間-数日である。以上の方法でリン酸エステル化した後、本発明の化合物を得るためには、使用したリン酸化剤に応じて、保護基を脱離すれば良い。これも公知の方法、例えば、酸またはアルカリによる加水分解、接触還元などで行なうことができる。

反応液からの回収、精製、単離には、シクロスポリンにおいて、これまでに用いられて来た公知の方法が応用できる（特開昭55-55150号公報、特開昭57-140753号公報、特開昭62-77399号公報など）。更に、本発明の化合物においては、リン酸基に着目した精製方法も非常に有利に適用できる。例えば、低pHにおける酢酸エチル、酢酸ブチル、クロロホルム、塩化メチレン、n-ブタノールなどでの溶媒抽出およびその溶媒層から高pHでの水層への転溶；活性炭、アンバーライトXAD（ローム・アンド・ハース社製）、ダイアイオンHP-20（三菱化成社製）などによる吸着とメタノール/水、アセトン/水などによる溶出；ダウエックス1×2（ダウケミカル社製）、QAE-セファデックスA-25（ファルマシア社製）、DEAE-セルローズワットマンDE-32（ワットマン社製）、DEAE-セファデックスA-

25（ファルマシア社製）などのイオン交換樹脂による吸着及び溶出；セファデックスG-10（ファルマシア社製）、バイオ・ゲルP-20（バイオラッド社製）などによるゲルろ過；セルロース、アビセルSP（アメリカン・ビスコース社製）などのカラムクロマトグラフィー；アセトンなどの溶剤添加による強制沈澱法；凍結乾燥法などをそれぞれ単独で或いは適宜組み合わせ、更に場合によっては、反復して使用される。

本発明化合物はリン酸基の塩の形態をとることができ、かかる塩は、公知の方法により得ることができ、例えば、遊離の本発明化合物に水酸化ナトリウム等の水酸化物を加え、攪拌処理することにより得ることができる。当該塩の例としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩のようなアルカリ金属塩；カルシウム塩、マグネシウム塩のようなアルカリ土類金属塩；アルミニウム塩のようなその他の金属塩；アンモニウム塩、モノエチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、モノエタノールアミン、ジエタノールアミンのような第一級、第二級又は第三級アミンによる塩；ベンザチン、プロカイン、ベンジルアミン、ジベンジルアミン、N-ベンジル-β-フェネチルアミン、L-エフェナミン、N,N'-ジベンジリエチレンジアミン、デヒドロアビエチルアミン、N-エチルピペリジン、ジシクロヘキシルアミンなどの有機塩基による塩等が含まれ、中でも生理学的に許容しうる塩が好ましく、特に、ナトリウム塩、カリウム塩などが好適である。

本発明化合物は、一般に遊離型の化合物よりも塩の形の方が、水溶性が高い。従って、医薬用途に使用する場合、その用途に応じて

塩の形の化合物を選択することが好ましい。

また、本発明化合物は、水和物を含む溶媒和物の形態をとることもできる。当該水和物等は、主に本発明化合物の合成・精製過程において生じ、そのまま単離することができる。当該溶媒和物は、遊離型本発明化合物の溶媒和物であっても、塩型の本発明化合物の溶媒和物であってもよい。

本発明化合物は、結晶多形をとる場合がある。この場合も本発明化合物に含まれる。

本発明化合物は、基本的に既存のシクロスポリン類のリン酸エステル体であるから、既存のシクロスポリン類が持つ効能を有する。特に、本発明化合物は免疫不全に起因する各種疾患及びそれらの疾患の治療薬として有用である。

具体的には、本発明化合物は腎移植における拒否反応の抑制、骨髄移植における拒否反応及び移植片対宿主病の抑制、ベーチェット病（眼症状のある場合）、肝移植における拒否反応の抑制、尋常性乾せん、膿泡性乾せん、乾せん性紅皮症、関節症性乾せんなどの治療薬として、また内因性ブドウ膜炎、角膜移植、春季角結膜炎、木質角結膜炎、乾燥眼症候群、前部ブドウ膜炎、オンコセルカ症などの眼疾患などの治療薬、心臓、肺臓、脾臓、皮膚および角膜における移植された臓器の排除防止、リウマチ性関節炎、真性糖尿病Ⅰ、全身性紅斑性狼瘡、かん皮症、ウエグナー氏肉芽腫症、好酸球性筋膜炎、原発性シロシス、グレーブス病、およびクローン病のような各種自己免疫疾患及び重症筋無力症、多発性硬化症などの治療薬として有用である。エイズ又はエイズ関連疾患の処置、アトピ

一性皮膚炎、アレルギー性接触皮膚炎などの疾患に対しても有用である。更に、ネフローゼ症候群（頻回再発型、ステロイド抵抗性）、再生不良性貧血、赤芽球ろうなど基本的に免疫不全に起因する各種疾患の治療薬としても有用である。

本発明化合物を医薬として投与する場合、本発明化合物はそのまま又は医薬的に許容される無毒性かつ不活性の担体中に、例えば0.01%～99.5%、好ましくは0.5%～90%含有する医薬組成物として、人を含む動物に投与することができる。

以下、本発明化合物に係る医薬組成物（以下「本発明組成物」という）について説明する。

担体としては、固形、半固形、又は液状の希釈剤、充填剤、及びその他の処方用の助剤一種以上が用いられる。本発明組成物は、投与単位形態で投与することが望ましい。本発明組成物は、経口投与、組織内投与、局所投与（経皮投与、点眼、経鼻等）又は経直腸的に投与することができる。これらの投与方法に適した剤型で投与されるのはもちろんである。例えば、経口投与及び組織内投与、特に経口投与が好ましい。経口投与が好ましいのは、本発明化合物の特徴の一つである。

免疫抑制剤としての本発明化合物の用量は、年齢、体重、等の患者の状態、投与経路、病気の性質と程度等を考慮した上で調整することが望ましいが、通常は、成人に対して本発明の有効成分量として、1日あたり、5 mg～1 g / 日 / ヒトの範囲が、好ましくは、10 mg～100mg / 日 / ヒトの範囲が適当である。場合によっては、これ以下でも足りるし、また逆にこれ以上の用量を必要とすることもある。

る。また1日2～3回に分割して投与することもできる。

経口投与は固形又は液状の用量単位、例えば、末剤、カプセル剤、錠剤、糖衣剤、顆粒剤、散剤、懸濁剤、液剤、シロップ剤、ドロップ剤、舌下錠その他の剤型によって行うことができる。

末剤は本発明化合物を適当な細かさにすることにより製造される。散剤は本発明化合物を適当な細かさと成し、ついで同様に細かくした医薬用担体、例えば澱粉、マンニトールのような可食性炭水化物その他と混合することにより製造される。必要に応じ風味剤、保存剤、分散剤、着色剤、香料その他のものを混じてもよい。

カプセル剤は、まず上述のようにして粉末状となった末剤や散剤あるいは錠剤の項で述べるように顆粒化したものを、例えばゼラチンカプセルのようなカプセル外皮の中へ充填することにより製造される。滑沢剤や流動化剤、例えばコロイド状のシリカ、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、固形のポリエチレングリコールのようなものを粉末状態のものに混合し、然るのちに充填操作を行うこともできる。崩壊剤や可溶化剤、例えばカルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、クロスカルメロースナトリウム、カルボキシメチルスターチナトリウム、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、を添加すれば、カプセル剤が摂取されたときの医薬の有効性を改善することができる。

また、本発明化合物の微粉末を植物油、ポリエチレングリコール、グリセリン、界面活性剤中に懸濁分散し、これをゼラチンシートで包んで軟カプセル剤とすることができる。錠剤は賦形剤を加えて粉

末混合物を作り、顆粒化もしくはスラグ化し、ついで崩壊剤又は滑沢剤を加えたのち打錠することにより製造される。粉末混合物は、適当に粉末化された物質を上述の希釈剤やベースと混合し、必要に応じ結合剤（例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコールなど）、溶解遅延化剤（例えば、パラフィンなど）、再吸収剤（例えば、四級塩）や吸着剤（例えばベントナイト、カオリン、リン酸ジカルシウムなど）をも併用してもよい。粉末混合物は、まず結合剤、例えばシロップ、澱粉糊、アラビアゴム、セルロース溶液又は高分子物質溶液で湿らせ、攪拌混合し、これを乾燥、粉碎して顆粒とすることができる。このように粉末を顆粒化するかわりに、まず打錠機にかけたのち、得られる不完全な形態のスラグを破砕して顆粒にすることも可能である。

このようにして作られる顆粒は、滑沢剤としてステアリン酸、ステアリン酸塩、タルク、ミネラルオイルその他を添加することにより、互いに付着することを防ぐことができる。このように滑沢化された混合物をついで打錠する。こうして製造した素錠にフィルムコーティングや糖衣を施すことができる。

また本発明化合物は、上述のように顆粒化やスラグ化の工程を経ることなく、流動性の不活性担体と混合したのちに直接打錠してもよい。シェラックの密閉被膜からなる透明又は半透明の保護被覆、糖や高分子材料の被覆、及び、ワックスよりなる磨上被覆の如きも用いる。

他の経口投与剤型、例えば溶液、シロップ、トローチ、エリキシルなどもまたその一定量が本発明化合物の一定量を含有するように用量単位形態にすることができる。シロップは、本発明化合物を適当な香味水溶液に溶解して製造され、またエリキシルは非毒性のアルコール性担体を用いることにより製造される。懸濁剤は、本発明化合物を非毒性担体中に分散させることにより処方される。可溶化剤や乳化剤（例えば、エトキシ化されたイソステアリルアルコール類、ポリオキシエチレンソルビトールエステル類）、保存剤、風味賦与剤（例えば、ペパミント油、サッカリン）その他もまた必要に応じ添加することができる。

必要とあらば、経口投与のための用量単位処方はいくつかのカプセル化してもよい。該処方はまた被覆をしたり、高分子・ワックス等中にうめこんだりすることにより作用時間の延長や持続放出をもたらすこともできる。

組織内投与は、皮下・筋肉又は静脈内注射用としたところの液状用量単位形態、例えば溶液や懸濁剤の形態を用いることによって行うことができる。これらのものは、本発明化合物の一定量を、注射の目的に適合する非毒性の液状担体、例えば水性や油性の媒体に懸濁し又は溶解し、ついで該懸濁液又は溶液を滅菌することにより製造される。注射液を等張にするために非毒性の塩や塩溶液を添加してもよい。更に安定剤、保存剤、乳化剤等を併用することもできる。

直腸投与は、化合物を低融点の水に可溶又は不溶の固体、例えばポリエチレングリコール、カカオ脂、半合成の油脂（例えば、ウイテプゾール、登録商標）、高級エステル類（例えばパルミチン酸ミ

リスチルエステル) 及びそれらの混合物に溶解又は懸濁させて製造した坐剤等を用いることによって行うことができる。

その他、局所投与は、軟膏剤、パップ剤、プラスター剤、パッチ剤、リニメント剤、点眼剤、経鼻剤などの剤型で行うことができる。軟膏剤は、脂肪、脂肪油、ラノリン、ワセリン、パラフィン、ろう、樹脂、プラスチック、グリコール類、高級アルコール、グリセリン、水、乳化剤、懸濁化剤若しくはそのほかの適当な添加剤を原料とするか、又はこれらを基剤とし、本発明化合物を加え、混和して製することができる。パップ剤は、本発明化合物の粉末をグリセリン、水又はそのほかの適当な液状の物質と混和し、精油成分を加えて製することができる。プラスター剤は、脂肪、脂肪油、脂肪酸塩、ろう、樹脂、プラスチック、精製ラノリン、ゴム若しくはこれらの混合物を原料とするか、又はこれらを基剤とし、本発明化合物を均等に混和して製することができる。点眼剤は、本発明化合物の一定量を滅菌精製水、生理食塩水、注射用蒸留水等に溶解又は懸濁し、一定容量とすることにより製することができる。

実 施 例

実施例、試験例により、本発明を以下に更に詳しく説明する。実施例に係る化合物は、本発明化合物の一例である。

実施例 1 〔フォスフォノトレオニン²〕シクロスポリン A の合成

バリウム2-シアノエチルフォスフェートジハイドレート484mg を5ml の強酸性陽イオン交換樹脂 (AG50W-X2、BIO-RAD 社製) の入った6ml の水に懸濁し、不溶の塩が消えるまで攪はんした。これを2ml の同樹脂を充填したカラムに流し、さらに20mlの水で溶出した後、減圧下濃縮乾固し、シアノエチルフォスフェートを調製した。以下の実施例で使用したシアノエチルフォスフェートは同様の方法で調製した。これにシクロスポリン C 187mg、ジシクロヘキシルカルボジイミド640mg、ピリジン10mlを加え、室温下63.5時間攪はんした。反応終了後、水3mlを加え、30分間攪はん後、不溶物をろ紙濾過で除去し、ろ液を減圧下濃縮した。これをメタノール5mlに懸濁し、セファデックスLH20 (ファルマシア社製) を充填したカラムクロマト(27X850mm)、メタノールで精製し、反応物の粗画分235mgを得、そのうち91mgに25% アンモニア水8mlを加え、室温下で24時間攪はんした。これを5N塩酸でpH 1~2に調整し、逆相C₁₈の樹脂 (MEGA BOND ELUT C₁₈カートリッジ、Analytichem 社製) に吸着させ、水洗後60から70% メタノールにて溶出し、減圧下溶媒を留去することにより、29mgの白色粉末を得た。さらにこれを下記の条件で高速液体クロマトグラフィによる分取精製を行って目的物を分画し、減圧下溶媒を留去した。

／分取条件

カラム：イナートシル PREP-ODS、20X250mm（ジーエルサイエンス製）

カラム温度：60℃

溶離液：70% アセトニトリル-0.3% リン酸水溶液

流速：7ml/min

反応物のリテンションタイム：17.2min

この分画を少量の水で懸濁し、逆相C₁₈の樹脂（Sep-Pak C₁₈カートリッジ、WATERS社製）に吸着させ、水洗後メタノールで溶出することにより、白色粉末状の〔フォスフォノトレオニン³〕シクロスポリンAを16mg得た。

／〔フォスフォノトレオニン³〕シクロスポリンAの物性値

1. 物質の色及び状態 白色粉末
2. 融点 171-175 °C
3. 旋光度 $[\alpha]^{20} = -138^{\circ}$ (c=0.69, メタノール 中)
4. 元素分析 C₄₂H₁₁₂N₁₀O₁₀P · 5/2H₂Oとして
 計算値(%) : C 55.42 ; H 8.78 ; N 11.47
 実測値(%) : C 55.14 ; H 8.45 ; N 11.37
5. 分子量 1297 (FABMS)
6. 質量分析 陰イオンFABMS 法 : (M-H)⁻、m/z 1296
 陽イオンFABMS 法 : (M+H)⁺、m/z 1298

実施例 2 〔フォスフォノトレオニン³〕シクロスポリンA ニナトリウム塩の合成

シクロスポリンC250mgにシアノエチルフォスフェート154mg、ジシクロヘキシルカルボジイミド422mg、ピリジン8mlを加え、室温

下16時間攪はんした。反応終了後、水2ml を加え、60分間攪はん後、不溶物を濾過除去し、減圧下濃縮した。これに25% アンモニア水40 mlを加え、室温下で19時間攪はんした。これを減圧下、約15mlまで濃縮し、2N塩酸でpH 1~2 に調整し、15mlの酢酸エチルで3回抽出した。得られた酢酸エチル層は水洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥し減圧下濃縮した。次にこれをメタノール10mlに溶かし、0.5N水酸化ナトリウムを0.9ml 滴下し、室温下16時間攪はん後、減圧下溶媒を留去した。これに水3ml を加え、逆相C₁₈ の樹脂 (MEGA BOND ELUT C₁₈カートリッジ、Analytichem 社製) に吸着させ、水洗後40 から60% メタノールにて溶出し、減圧下溶媒を留去することにより、目的とする二ナトリウム塩を204mg 得た。

／ (フォスフォノトレオニン³) シクロスポリンA 二ナトリウム塩の物性値

- | | |
|-------------|--|
| 1. 物質の色及び状態 | 無色結晶性微粉末 |
| 2. 融点 | 209-210 °C |
| 3. 旋光度 | (α) ²⁰ = -158 ° (c=0.48 、メタノール 中) |
| 4. 元素分析 | C ₄₂ H ₁₁₀ N ₁₁ O ₁₁ PNa ₂ · 3H ₂ Oとして |
| 計算値(%) | : C 53.32 ; H 8.37 ; N 11.03 |
| 実測値(%) | : C 53.03 ; H 8.44 ; N 11.02 |
| 5. 分子量 | 1341 (FABMS) |
| 6. 質量分析 | 陽イオンFABMS 法 : (M+H) ⁺ 、m/z 1342 |

またシクロスポリンC200mgを用いて同様にリン酸化し、0.2N水酸化ナトリウムにてシアノエチル基を脱離後、マイクロアシライザー

G1、アシブレックスカートリッジAC-210-10（いずれも旭化成社製）にて脱塩後、減圧下濃縮し、セファデックスLH20（ファルマシア社製）を充填したカラムクロマト、メタノールで精製すると白色粉末の反応物が16mg得られた。本化合物はFAB MSによる分子量測定により〔フォスフォノトレオニン⁸〕シクロスポリンAの一ナトリウム塩であることが同定された（質量分析；陽イオンFABMS 法：(M+H)⁺、m/z 1320）。

実施例3 〔フォスフォノ-D-セリン⁸〕シクロスポリンAの合成

〔D-セリン⁸〕シクロスポリンA 0.7g、シアノエチルフォスフェート0.5g、ジシクロヘキシルカルボジイミド1.5g、ピリジン20mlを添加し、20時間攪はんした。水5mlを加え、1時間攪はん後、ろ紙濾過して不溶物を除去した。ろ液を減圧下濃縮乾固し、アンモニア水100mlを添加し、室温下、一夜攪はんした。これを塩酸でpH 1～2に調整し、酢酸エチル150mlで3回抽出し、無水硫酸ナトリウムで脱水し、減圧下溶媒を留去した。これをセファデックスLH-20（ファルマシア社製）を充填したカラムクロマト（27X 270mm）、メタノールにて精製し、〔フォスフォノ-D-セリン⁸〕シクロスポリンAを0.34g得た。

／〔フォスフォノ-D-セリン⁸〕シクロスポリンAの物性値

1. 物質の色及び状態 白色粉末
2. 融点 170-174 °C
3. 旋光度 $[\alpha]^{20} = -167^\circ$ (c=0.51、メタノール中)
4. 元素分析 $C_{42}H_{112}N_{11}O_{11}P \cdot 3/2H_2O$ として

計算値(%) : C 56.18 ; H 8.74 ; N 11.62

実測値(%) : C 56.12 ; H 8.55 ; N 11.45

5. 分子量 1297 (FABMS)

6. 質量分析 陰イオンFABMS 法 : (M-H)⁻、m/z 1296

陽イオンFABMS 法 : (M+H)⁺、m/z 1298

実施例 4 〔フォスフォノ-D-セリン⁸〕シクロスポリンA ニナトリウム塩の合成

実施例 3 と同様にして、〔D-セリン⁸〕シクロスポリンA のリン酸化を行った。〔D-セリン⁸〕シクロスポリンA 120mg にシアノエチルフォスフェート74mg、ジシクロヘキシルカルボジイミド204mg、ピリジン4ml を加え、64時間攪はんした。次に水0.5ml を加え、30分間攪はんした後、ろ紙濾過により不溶物を除去した。これを減圧下濃縮乾固し、25% アンモニア水20mlを加え21時間攪はん後、ろ紙濾過により再び不溶物を除去した。減圧下これを濃縮乾固した後、0.5Nの水酸化ナトリウム水溶液を0.7ml 加え、20時間攪はんした。減圧下溶媒を留去し、逆相C₁₈の樹脂 (MEGA BOND ELUT C₁₈カートリッジ、Analytichem 社製) に吸着させ、水洗後40% メタノールにて溶出し、減圧下溶媒を留去することにより、目的とする二ナトリウム塩を70mg得た。

／〔フォスフォノ-D-セリン⁸〕シクロスポリンA ニナトリウム塩の物性値

1. 物質の色及び状態 無色結晶性微粉末
2. 融点 199-203 °C
3. 旋光度 $[\alpha]^{20} = -159^{\circ}$ (c=0.27、メタノール中)
4. 元素分析 C₄₂H₁₁₀N₁₁O₁₆PNa₂・5H₂Oとして

計算値(%) : C 51.98 ; H 8.44 ; N 10.75

実測値(%) : C 51.72 ; H 8.15 ; N 10.74

5. 分子量 1341 (FABMS)

6. 質量分析 陽イオンFABMS 法 : (M+H)⁺、m/z 1342

実施例 5 〔フォスフォノ-D-セリン⁸〕シクロスポリンA ニベンジルアミン塩の合成

実施例 4 で得られた〔フォスフォノ-D-セリン⁸〕シクロスポリンAの二ナトリウム塩20mgを水1ml に溶かし、2Nの塩酸でpH 1~2に調整し、酢酸エチル1ml で3回抽出し、硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下濃縮乾固し、17mgの白色物質を得た。これにメタノール0.5 mlを加え、ベンジルアミン4 μ l を加え、一夜攪はんした。減圧下溶媒を留去し、水1ml を加え、逆相C₁₈の樹脂(SEP-PAK C₁₈ カートリッジ、WATERS社製)に吸着させ、水洗後40% メタノールにて溶出し、減圧下溶媒を留去することにより、目的とするニベンジルアミン塩を13mg得た。

〔フォスフォノ-D-セリン⁸〕シクロスポリンA ニベンジルアミン塩の物性値

1. 物質の色及び状態 白色粉末

2. 融点 164-166 °C

3. 旋光度 $[\alpha]^{20} = -199^\circ$ (c=0.28、メタノール中)

4. 元素分析 C₇₁H₁₁₃N₁₃O₁₆P · 7H₂Oとして

計算値(%) : C 55.69 ; H 8.86 ; N 11.11

実測値(%) : C 55.98 ; H 8.55 ; N 11.17

実施例 6 〔フォスフォノトレオニン⁸、フォスフォノ-D-セリン⁸〕

）シクロスポリンA 四ナトリウム塩の合成

実施例3と同様にして、〔D-セリン¹〕シクロスポリンCのリン酸化を行った。〔D-セリン¹〕シクロスポリンC 30mg にシアノエチルフォスフェート39mg、ジシクロヘキシルカルボジイミド102mg、ピリジン2ml を加え、65時間攪はんした。次に水0.5ml を加え、30分間攪はんした後、ろ紙濾過により不溶物を除去した。これを減圧下濃縮乾固し、アンモニア水6ml を加え21時間攪はん後、ろ紙濾過により再び不溶物を除去した。減圧下これを濃縮乾固した後、0.5Nの水酸化ナトリウム水溶液を0.2ml 加え、20時間攪はんした。減圧下溶媒を留去し、逆相C₁₈の樹脂（SEP-PAK C₁₈ カートリッジ、WATERS社製）に吸着させ、水洗後40% メタノールにて溶出し、減圧下溶媒を留去することにより、目的とする四ナトリウム塩を白色粉末として8mg 得た。本化合物はFAB MSによる分子量測定により〔フォスフォノトレオニン¹、フォスフォノ-D-セリン¹〕シクロスポリンAの四ナトリウム塩であることが同定された（質量分析；陽イオンFABMS法：(M+H)⁺、m/z 1482）。

試験例1 IL-2産生阻害活性

シクロスポリン類の免疫抑制活性は、T-細胞のIL-2産生遺伝子発現抑制に基づいていることが知られている。従って、シクロスポリン類の生物活性は、T-細胞のIL-2産生阻害の検討をすれば良い。そこで、T-細胞の一種であるジャーカット細胞（Jurkat cell、ヒトT-細胞の腫瘍細胞）を用いて、本発明化合物の生物活性を検討した。

RPMI-1640 培地（フローラボラトリーズ社製、10% heat-inactivated FBS、300 mg/l L-glutamine、50 U/ml

streptomycin、 50 U/ml penicilin、 25 mM hepes、 50 μ M 2-mercaptoethanol)にて対数増殖期としたジャーカット (Jurkat) 細胞の細胞濃度を 8×10^5 /ml とし 0.1ml を 96 ウエルマルチプレートに分注した。次に、IL-2 産生の刺激剤としてコンカナバリン A を 10 μ l 加え更に各種濃度の試料を 20 μ l 添加した。培地の添加により最終容量を 0.2ml/ウエルとし 37°C の炭酸ガスインキュベーターにて 24 時間培養した。培養終了後直ちに各ウエルについて遠心処理 (1000 rpm x 5 min) を行い上清を得た。

IL-2 の測定は IL-2 依存性細胞として知られている CTLL-2 細胞を用いるバイオアッセイ法により行なった。

対数増殖期とした 0.1ml の CTLL-2 細胞 ($40,000$ /ml) に前記した上清を適宜希釈した後、0.1ml 分注し 37°C にて炭酸ガスインキュベーターで 48 時間培養した。培養終了後細胞増殖を MTT アッセイにて測定した。CTLL-2 細胞増殖率と IL-2 濃度の関係は、予めリコンビナント IL-2 について求めておき、これをスタンダードカーブとして測定した CTLL-2 細胞増殖率より IL-2 濃度を決定した。

IL-2 産生阻害率は、下記式(1)により求め、各濃度における阻害率より各試料の IC_{50} 値を算出した。その結果を表 2 に示す。

$$IL-2 \text{ 産生阻害率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{試料添加細胞での IL-2 産生量}}{\text{試料無添加細胞での IL-2 産生量}} \right) \times 100 \quad \dots(1)$$

表 2

試料名	IL-2産生阻害濃度 (IC ₅₀ ng/ml)
シクロスポリンA	3
シクロスポリンC	12
[D-セリン ⁸]シクロスポリンA	6
[フォスフォノトレオニン ⁸]シクロスポリンA	49
[フォスフォノ-D-セリン ⁸]シクロスポリンA	19

表 2 より明らかなように本発明化合物は、非リン酸エステル体に比して活性は低下するが、それ自体で強いIL-2産生阻害活性を有していた。

試験例 2 水に対する溶解性

シクロスポリンA、シクロスポリンC、[D-セリン⁸]シクロスポリンA、[フォスフォノ-D-セリン⁸]シクロスポリンA ニナトリウム塩、[フォスフォノトレオニン⁸]シクロスポリンA ニナトリウム塩をそれぞれ乳鉢で粉碎して試験管に一定量ずつ加えた。次いで、各々の試験管に蒸留水を試料濃度が250mg/mlとなる様に加え30℃にて30分間振盪攪拌した。それぞれの試験管から250 μl ずつエッペンチューブに採り、遠心処理(10,000rpm x 10min)した。その上清を採って、蒸留水にて希釈後HPLCにて定量した。

[フォスフォノ-D-セリン⁸]シクロスポリンA ニナトリウム塩及び[フォスフォノトレオニン⁸]シクロスポリンA ニナトリウム塩については、500mg/mlとなるように蒸留水を加え上記と同様の処理にて再度溶解度を求めた。

HPLC条件：カラム イナートシルC8 (4.6x250mm)、

移動相 アセトニトリル-メタノール-蒸留水-

リン酸 (50 : 35 : 15 : 0.005)、

カラム温度 75°C、UV 210nmで検出

表 3

試料名	溶解度 (mg/ml)
シクロスポリンA	0.0267
シクロスポリンC	0.0297
[D-セリン ¹]シクロスポリンA	0.0351
[フォスフォノ-D-セリン ¹]シクロスポリンA 二ナトリウム塩	500<
[フォスフォノトレオニン ²]シクロスポリンA 二ナトリウム塩	250<

表 3 に既知のシクロスポリン A、C と対比して示した。表 3 より明らかなように本発明化合物は既存のシクロスポリン A、C 等と比べ約 7000 倍以上も水溶性が高かった。

試験例 3 腎毒性の検討

リチウムクリアランス法により、腎毒性を評価した。ここで検討したリチウムクリアランス法が腎障害の指標としての価値を有することは既に報告されている（武井孝、日本泌尿器学会誌、83巻、40-47 頁、1992年）。

7 週齢の雄 S D ラットを用い、1 群 10 匹で対照群、シクロスポリン A 10mg/kg 投与群、シクロスポリン C 投与群、[フォスフォノトレオニン²]シクロスポリン A 投与群、[フォスフォノ-D-セリン¹]シクロスポリン A 投与群の 5 群を設け、各試料を 5mg/ml の濃度に調整した後、腹腔内に 2ml/kg の容量で 7 日間連続注射した。対照群には試料の調整に用いた溶媒を同様に投与した。投与最終日に炭酸リチウム水溶液（23.6mg/10ml/kg）を強制経口投与した後 P-2 飼料（船橋農場製）に炭酸リチウムを加えたリチウム含有食（LiCO₃ 738.9mg/kg/food）を与えた。翌日ラット頸静脈より採血した後代謝ケージに入れリチウム含有食下で 24 時間採尿し、その尿量をメスシ

リンダーで測定した。代謝ケージからラットを出したのち直ちに採血し、採尿前後2点のリチウム値の平均値をラットの血中リチウム値とした。ラットの体重は代謝ケージから出した直後に測定した。血中リチウムは採血後、3000rpmで10分間遠心分離し得られた血漿を用いて、尿中リチウムは採尿後1500rpmで10分間遠心分離し得られた上清を用いて、ともに蛍光光度計（775型、日立製作所製）により測定した。上記の測定値から次式(2)により、ラット体重100g当りの24時間リチウムクリアランス(CL_L)を算出した。

$$24\text{時間 } CL_L/100g = \text{尿量} \times 100 / \text{ラット体重} \cdot \text{尿Li値} / \text{血中Li値} \quad \dots(2)$$

表 4

試料名	(%) *
対照群	100
シクロスポリンA	53
シクロスポリンC	39
[フォスフォノトレオニン [®]]シクロスポリンA 二ナトリウム塩	125
[フォスフォノ-D-セリン [®]]シクロスポリンA 二ナトリウム塩	98

* 対照群に対する試料投与群の血中リチウム量の割合

結果を表4に既知のシクロスポリンA、Cと対比して示した。表中で数値がコントロールの100より小さいことは腎毒性の所見を意味している。表4より明らかなように既知のシクロスポリンA、Cが腎毒性を示しているのに対し、本発明化合物の腎毒性は極めて低かった。

試験例4 経口投与時の吸収とリン酸基の遊離

体重250gのSD系ラットに30mg/kg となるように0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁させた〔D-セリン[®]〕シクロスポリンA及び〔フ

ォスフォノ-D- セリン[®]〕シクロスポリンAを経口投与し経時毎に頸部静脈より採血した。採血後遠心処理（10,000 rpm x 5 min）により上清を分取し、前処理カラム（Sep-pack C₁₈ Vac、waters）に通液して蒸留水、40% メタノールにて洗浄した。50% メタノールから100%メタノールの10% ステップによりカラムからの溶出面分を採り、その50μl をHPLCにインジェクトしてそれぞれの濃度を求めた。それらの濃度より血中濃度を計算した。結果を表5に示す。

表 5

投与後(hr) の時間	0.5	1	2	4	8	24	24hrまでの 血中濃度 の総和
①	895	4321	1915	1021	533	69	8754
②	1413	3115	2516	2391	910	103	10448
③	391	813	971	536	311	31	3053
④	1804	3928	3437	2927	1221	134	13501

表中の血中濃度は、ng/ml である。

- ①：〔D-セリン[®]〕シクロスポリンA
 ②：〔ォスフォノ-D- セリン[®]〕シクロスポリンAを投与した場合に、リン酸を遊離した〔D-セリン[®]〕シクロスポリンAの血中濃度
 ③：〔ォスフォノ-D- セリン[®]〕シクロスポリンAを投与した場合の〔ォスフォノ-D- セリン[®]〕シクロスポリンAの血中濃度
 ④：②と③の合計

表5より明らかなように本発明化合物は既知のシクロスポリン類（非リン酸エステル体）に比べて吸収速度が早く、また約1.5倍程度総吸収量が増加した。また、表5から明らかなように本発明化合物は、インビボにおいて遊離し、より生物活性の強い非リン酸エステル体へと変換した。

製 剤 例

製剤例1 固形剤

35

1錠180mg 中、以下の処方に従って常法により錠剤を調製した。

処方	実施例 4 の化合物	100mg
	乳糖	61mg
	澱粉	14mg
	ポリビニルアルコール	2mg
	タルク	2mg
	ステアリン酸マグネシウム	1mg

製剤例 2 注射剤

1管1ml中、以下の処方に従って常法により注射剤を調製した。

処方	実施例 4 の化合物	10mg
	塩化ナトリウム	90mg
	炭酸水素ナトリウム	10mg
	注射用蒸留水	適量

製剤例 3 カプセル剤

1カプセル285mg 中、以下の処方に従って常法により硬カプセル剤を調製した。

処方	実施例 4 の化合物	100mg
	乳糖	107mg
	微結晶セルロース	10mg
	ステアリン酸マグネシウム	3mg

発 明 の 効 果

本発明化合物は、それ自体で強い生物活性を有しており且つ生体内でより活性の強い非リン酸エステル体へと一部変換される。また、

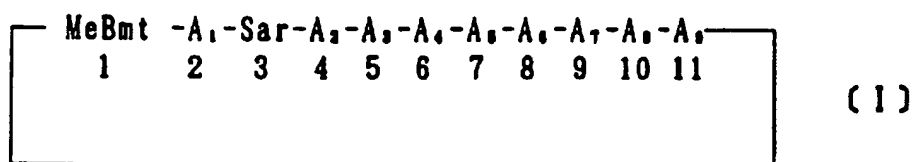
水に対する溶解度が高く、更に生体内における吸収速度が早く吸収量が多い。従って、特殊な製剤形態をとらなくても投与することができる。生体内において薬効を発揮することができる。

更に、本発明化合物は腎毒性が極めて低い。生体内で非リン酸エステル体に多少加水分解されるにもかかわらず、腎毒性が極めて低い理由については今のところ不明である。

請求の範囲

1. 水酸基を有するアミノ酸を構成要素とするシクロスポリン類において、該水酸基の全部又は一部がリン酸エステル ($-P(O)(OH)_2$) 化されている、シクロスポリン類のリン酸エステル誘導体若しくはその塩、又はそれらの溶媒和物。

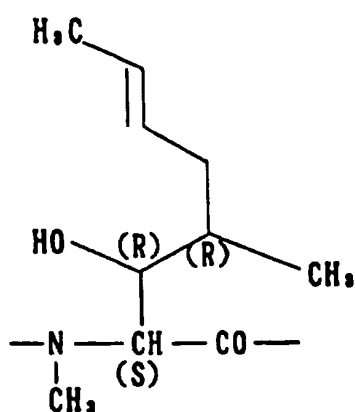
2. 水酸基を有するアミノ酸を構成要素とするシクロスポリン類が、次の構造式〔I〕で表される、請求項1記載のシクロスポリン類のリン酸エステル誘導体若しくはその塩、又はそれらの溶媒和物。



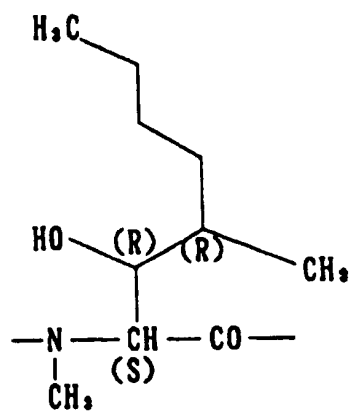
ここで、A₁はD-若しくはL- α -アミノ酪酸、D-若しくはL-アラニン、D-若しくはL-トレオニン、D-若しくはL-バリン、D-若しくはL-3-ヒドロキシノルバリン又はD-若しくはL-4-ヒドロキシノルバリンを表し、A₂はD-若しくはL-N-メチルロイシン、D-若しくはL-ロイシン又はD-若しくはL-バリンを表し、A₃はD-若しくはL-バリン又はD-若しくはL-ノルバリンを表し、A₄はD-若しくはL-ロイシン又はD-若しくはL-メチルロイシンを表し、A₅はD-若しくはL-アラニン又はD-若しくはL- α -アミノ酪酸を表し、A₆はD-若しくはL-アラニン又はD-若しくはL-セリンを表し、A₇はD-若しくはL-メチルロイシン又はD-若しくはL-ロイシンを表し、A₈はD-若しくはL-メチルロイシン又

はD-若しくはL-ロイシンを表し、A₆はD-若しくはL-バリン又はD-若しくはL-メチルバリンを表す。MeBmt は、次の構造式〔II〕で示されるN-メチル-(4R)-4-ブタ-2E-エン-1-イル-4-メチル-(L)トレオニン又は次の構造式〔III〕で示される〔II〕のジヒドロ体を表す。

Sar は、ザルコシン (N-メチル-L-グリシン) を表す。



〔II〕



〔III〕

3. A₁がL-トレオニンである請求項2記載のシクロスポリン類のリン酸エステル誘導体若しくはその塩、又はそれらの溶媒和物。

4. A₆がD-セリンである請求項2記載のシクロスポリン類のリン酸エステル誘導体若しくはその塩、又はそれらの溶媒和物。

5. 〔フォスフォノトレオニン²〕シクロスポリンA、〔フォスフォノ-4-ヒドロキシノルバリン²〕シクロスポリンA、〔フォスフォノ-D-セリン²〕シクロスポリンA及び〔フォスフォノトレオニン²、フォスフォノ-D-セリン²〕シクロスポリンAからなる群より選択されるシクロスポリン類のリン酸エステル誘導体若しくはその塩、又はそれらの溶媒和物。

6. 請求項1乃至5記載のシクロスポリン類のリン酸エステル誘導体若しくはその塩、又はそれらの溶媒和物を含有することを特徴とする医薬組成物。

7. 請求項1乃至5記載のシクロスポリン類のリン酸エステル誘導体若しくはその塩、又はそれらの溶媒和物を含有することを特徴とする免疫抑制剤。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/01906

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C07K7/64, A61K38/13

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C07K7/64, A61K38/13

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 5-508653, A (Vacsyn France, S.A.), December 2, 1993 (02. 12. 93), Claims 1, 15 WO, 92/01475, A1 & EP, 539457, A1	1 - 7
A	JP, 3-218396, A (Sandoz AG.), September 25, 1991 (25. 09. 91), Claim & EP, 414632, A2 & CA, 2021788, A & US, 5284826, A	1 - 7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

December 12, 1995 (12. 12. 95)

Date of mailing of the international search report

January 16, 1996 (16. 01. 96)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C07K7/64, A61K38/13

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C07K7/64, A61K38/13

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ON LINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 5-508653, A (バクシン・フランス・エス・アー), 2. 12月 1993 (02. 12. 93), 請求の範囲第1項, 請求の範囲第15項 WO, 92/01475, A1&EP, 539457, A1	1-7
A	JP, 3-218396, A (サンド・アクチエンゲゼルシャフト), 25. 9月 1991 (25. 09. 91), 特許請求の範囲 & EP, 414632, A2 & CA, 2021788, A&US, 5284826, A	1-7

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリ

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日
若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献
(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の
後に公表された文献「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と
矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため
に引用するもの「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規
性又は進歩性がないと考えられるもの「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文
献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性
がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12. 12. 95

国際調査報告の発送日

16.01.96

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

福井 悟

4 H 9 1 6 0

電話番号 03-3581-1101 内線

3443

This Page Blank (uspto)